

iAP20 Rec'd PCT/PTO 09 JUN 2006

明 細 書

人工脂質二重膜における脂質置換方法、その脂質置換方法を用いて得られる人工脂質二重膜、その人工脂質二重膜を製造する装置、および、イオン透過測定装置

技術分野

[0001] 本発明は、膜タンパク、ペプチド等を介した微小電流の検出に利用される脂質平面膜法において、人工脂質二重膜の脂質の組成を変える脂質置換方法、この脂質置換方法を用いて作製された人工脂質二重膜、および、この人工脂質二重膜を製造する装置、ならびに、脂質二重膜におけるイオン透過を測定するための装置であって、上記の脂質置換を利用して測定途中に人工脂質二重膜における脂質組成を変更するイオン透過測定装置に関するものである。

背景技術

[0002] 生物が生命活動を維持するためには、生物を構成する細胞が細胞膜を介して外部とイオンの授受を行うことが必要となる。このイオンの授受は、細胞膜上に存在するイオンチャネルと呼ばれる膜タンパク質などの分子によって行われるため、細胞膜上でのイオンチャネルの作用について研究することは、医学・細胞工学の基礎研究および応用開発において重要である。

[0003] このイオンチャネルは、イオンの通り道であるポアとチャネルの開閉を制御するゲートから構成され、ゲートは膜電位や生理活性物質を感受することにより開閉する。この機能は、イオンがイオンチャネルを透過するときのイオン電流を測定することによって観察することができる。単一のイオンチャネルのイオン電流を測定する方法としてパッチクランプ法が用いられるが、チャネルの構造機能相関研究を深めるために単純な再構成系で実験を行う必要のある場合に用いられるのが脂質平面膜法である。

[0004] この脂質平面膜法は、イオン、水、人工脂質二重膜、イオンチャネルという最小限の単純系を用いて、イオンチャネルの基本的な構造や詳細な構造機能相関について調査するというものである(非特許文献1参照)。また、この脂質平面膜法を利用してイオンチャネル研究を行うための装置として、イオンチャネル分子の構造と機能を

同時に測定できる測定装置が、本発明者等により報告されている(非特許文献2参照)。

[非特許文献1]

「新パッチクランプ実験技術法」、老木成稔著、吉岡書店、2001年、208-215頁、『19. チャネル研究のための脂質平面膜法』

[非特許文献2]

Ide, T., Takeuchi, U., Yanagida, T. Development of an Experimental Apparatus for Simultaneous Observation of Optical and Electrical Signals from Single Ion Channels, Single Mol. 3(2002)1, 33-42

上記非特許文献1や非特許文献2に記載されているように、脂質平面膜法では、人工の脂質二重膜を形成する。それゆえ、脂質組成が様々に異なる脂質二重膜を形成することで、脂質組成がイオンチャネルに及ぼす影響を調査することも可能である。

[0005] しかしながら、上述の従来の脂質平面膜法においては、一旦人工脂質二重膜を作製してしまうと、測定の途中で脂質の組成を変更することは不可能である。そのため、脂質組成とイオンチャネルとの関係を調査しようとした場合、異なる組成の脂質溶液をそれぞれ調製し、人工脂質二重膜を別々に形成しなければならない。

[0006] このように、従来の脂質平面膜法において、人工脂質二重膜の脂質組成を変更するためには、再度人工膜を形成し直す必要があり二度手間となる。

[0007] ところで、イオンチャネルとして働く膜タンパク質の機能は、膜の脂質組成に依存するため、イオン透過の測定を行いながら脂質組成を変更することは、イオンチャネルの研究を行う上で有用性が高い。しかしながら、上述の従来の方法では、脂質組成とイオンチャネルとの関係を経時的に観察することはもちろん不可能であり、脂質組成によってはイオンチャネルを組み込むこと自体が不可能な場合もある。

発明の開示

[0008] 本願発明者は、上記の問題点について鋭意検討した結果、脂質平面膜法によって形成された人工脂質二重膜において、脂質二重層が形成されている領域の周囲に形成されたバルク相に細管を接触させて、この細管を通じて上記人工脂質二重膜を

形成している脂質溶液とは組成の異なる脂質溶液を添加すると、脂質の拡散によって当該脂質二重膜の組成を変えることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0009] 本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであって、脂質平面膜法において、人工脂質二重膜を再形成することなく、人工脂質二重膜の脂質の組成を簡単に変えることのできる脂質置換方法、この脂質置換方法を用いて得られる人工脂質二重膜およびその製造装置、ならびに、この脂質置換方法を利用して、人工脂質二重膜の脂質組成を変えながらイオン透過を測定することのできるイオン透過測定装置を提供することを目的とする。

[0010] すなわち、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法は、人工脂質二重膜のバルク相に脂質置換用の細管を取り付け(接触させ)、該細管から上記人工脂質二重膜を形成している第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を添加することを特徴とするものである。

[0011] より具体的には、本発明の脂質置換方法は、第1の脂質溶液を用いて脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜形成工程と、脂質置換用の細管に上記第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を注入する脂質溶液注入工程と、上記細管を上記脂質二重膜のバルク相に接触させ、上記第2の脂質溶液をバルク相へ添加する脂質溶液添加工程とからなることを特徴としている。

[0012] 上記の脂質置換方法によれば、第1の脂質溶液中の脂質によって形成された人工脂質二重膜から、連続して第2の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜を得ることができる。つまり、これまで人工脂質二重膜において脂質の組成を変更するために、人工脂質二重膜形成工程を再度行って人工脂質二重膜を最初から形成し直す必要があったものを、本方法では、既に形成されている人工脂質二重膜を破壊することなく脂質の組成を変更させることができる。

[0013] なお、ここで人工脂質二重膜の「バルク相」とは、脂質平面膜法によって形成された人工脂質二重膜において、脂質二重膜部分を取り囲むように形成されている脂質溶液からなる環状の相のことを意味する。

[0014] また、本発明の人工脂質二重膜は、上記の何れかの人工脂質二重膜の置換方法

を用いて、脂質組成が変えられた人工脂質二重膜である。この人工脂質二重膜は、形成された後に脂質の組成を変化させることができるため、組み込まれるイオンチャネルの機能解析に有効に利用することができる。

[0015] また、本発明の人工脂質二重膜製造装置は、水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置され、上記2つの溶液槽を仕切る隔壁とを備え、上記隔壁に設けられた開口部の周辺に第1の脂質溶液を塗布することによって、該開口部に脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜製造装置において、上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられており、上記細管から上記第1の脂質溶液とは組成の異なる第2の脂質溶液を注入することによって、上記第2の脂質溶液中の脂質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することを特徴とするものである。

[0016] また、本発明のイオン透過測定装置は、水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記水溶液中を流れる電流を検出する電極とを備え、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との境界に形成された人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオンの透過を測定するイオン透過測定装置において、上記人工脂質二重膜は、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置された隔壁に設けられた開口部に形成されており、上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられていることを特徴とするものである。それゆえ、上記のイオン透過測定装置は、イオンチャネルの機能に対して脂質分子が及ぼす影響を調査することができ、イオンチャネルの機能解析に役立てることができる。

[0017] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]本発明にかかる人工脂質二重膜製造装置の一例の構成を示す模式図である。
[図2](a)は、チャネル分子(イオンチャネル)が組み込まれた人工脂質二重膜の断面を示す模式図であり、(b)は、人工脂質二重膜における脂質置換方法について説明するための模式図である。

[図3]本発明にかかるイオン透過測定装置の一例の構成を示す模式図である。

[図4]本実施例の人工脂質二重膜の脂質置換実験において、溶液中の電流を経時的に検出した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0019] 本発明の実施の形態について以下に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

[0020] (1)人工脂質二重膜について

本発明の実施の形態について説明するに先立ち、一般的な人工脂質二重膜について説明する。

[0021] 人工脂質二重膜とは、生体膜の基本構成である脂質二重層を人工的に形成したものであり、例えば、リン脂質の単分子膜を張った水槽に小孔を開けたテフロン(登録商標)板を入れることによって形成させることができる。さらに、このようにして形成された脂質二重膜にイオンチャネルとして働く膜タンパク質(チャネル分子)を組み込むことによって、実際の生体膜を模した人工脂質二重膜が得られる。このイオンチャネルが組み込まれた人工脂質二重膜は、例えば、疾患に関与すると考えられるイオンチャネルの機能の研究などに利用することができる。

[0022] この人工脂質二重膜の作製は、従来公知の種々の方法によって実施することができる。その一例としては、非特許文献1に記載のペインティング法や貼り合わせ法(フォールディング法とも呼ばれる)などを挙げることができる。

[0023] 図2(a)には、人工脂質二重膜の断面構造を模式的に示す。この図に示すように、人工脂質二重膜は、両親媒性のリン脂質分子21が規則的に並ぶことによって水中(あるいは、水溶液中)で二層構造を形成している。このリン脂質分子の二層構造において、各リン脂質分子のリン酸や塩基からなる親水性部分が外部の水相に接し、脂肪酸からなる疎水性部分が互いに向き合うようにして並んでいる。

[0024] この人工二重脂質膜は、直径0.1〜0.5mm程度の開口部(小孔)Cが設けられたテフロン(登録商標)板あるいはプラスチック板などの支持体23の開口部Cに形成されている。つまり、この人工脂質二重膜は、有機溶媒に溶解されたリン脂質(これを脂質溶液22と呼ぶ)を上記開口部Cの周辺に塗布することによって、両親媒性分子で

あるリン脂質が水と有機溶媒の界面に配向して単分子層となり、さらに、2層の単分子層の間から有機溶媒が排除されたことによって形成されたものである。それゆえ、この人工脂質二重膜には、脂質二重膜部分Aと、それを取り囲んで形成される脂質溶液から成る環状のバルク相Bとが存在する。

[0025] さらに、上記人工脂質二重膜には、イオンチャネル24を脂質二重層構造の間に埋め込ませることによって、イオンチャネル24を組み込むこともできる。イオンチャネルを上記人工脂質二重膜に埋め込む方法は、従来公知の方法を用いることができ、特に限定されるものではない。具体的には、例えばイオンチャネルを含む膜分画を界面活性剤で可溶化し、膜ベシクルへ再構成し、人工脂質二重膜に融合させる方法が挙げられる。

[0026] (2)人工脂質二重膜における脂質置換方法

続いて、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法について、図2(b)を用いて説明する。

[0027] 本発明の人工脂質二重膜の脂質置換方法は、人工脂質二重膜のバルク相に脂質置換用の細管を取り付け、該細管から上記人工脂質二重膜を形成している第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を添加するものである。

[0028] 具体的には、上記脂質置換方法は、第1の脂質溶液を用いて脂質二重膜を人工的に形成する人工脂質二重膜形成工程と、脂質置換用の細管に上記第1の脂質溶液とは異なる脂質組成の第2の脂質溶液を注入する脂質溶液注入工程と、上記人工脂質二重膜のバルク相Bに脂質置換用の細管17を接触させ、上記第2の脂質溶液をバルク相へ添加する脂質溶液添加工程とからなる。

[0029] 図2(b)は、人工脂質二重膜のバルク相Bに脂質置換用の細管17を接触させた脂質溶液添加工程の様子を示す。この脂質溶液添加工程では、細管17の上端部を、例えば、注射器、スポイト、あるいは、パッチクランプ法で微小電極内に薬物を添加する装置であるマイクロインジェクターなどのような添加・注入手段(図示せず)と接続しておくことによって、上記第2の脂質溶液のバルク相Bへの添加を容易に行うことができる。なお、細管17に第2の脂質溶液を注入する脂質溶液注入工程においても、上記の添加・注入手段を用いれば、細管17へ容易に第2の脂質溶液を注入するこ

とができる。

- [0030] なお、上記人工脂質二重膜形成工程は、上記(1)で説明したように、従来公知の種々の脂質二重膜形成方法によって実施すればよく、特に限定されるものではない。この脂質二重膜形成方法としては、例えば、ペインティング法あるいはフォールディング法が好適に用いられる。言い換えれば、本発明の脂質置換方法は、バルク相を有する人工脂質二重膜であれば適用することが可能であり、特にペインティング法やフォールディング法で形成された人工脂質二重膜に適用することが好ましい。
- [0031] 上記の脂質置換方法によれば、第1の脂質溶液によって人工脂質二重膜を形成した後に、第1の脂質溶液とは脂質組成の異なる第2の脂質溶液を細管17から添加することによって、第2の脂質溶液に含まれる脂質からなる人工脂質二重膜へ変化させることができる。
- [0032] つまり、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法では、バルク相Bが支持体13を覆うように形成されている脂質膜を構成するリン脂質11と連続していることを利用したものである。脂質二重膜部分Aは非常に弱い構造であるため、この部分に直接細管を接触させることは不可能であるが、バルク相Bに多少の力学刺激を加えても脂質二重膜部分Aの構造を破壊することはない。そこで、本発明にかかる脂質置換方法では、上記バルク相Bに細管を通じて脂質溶液を添加し、脂質の拡散を脂質二重膜部分の脂質組成を変更しているのである。
- [0033] したがって、本方法を用いれば、第1の脂質溶液中の脂質によって形成された人工脂質二重膜から、連続して第2の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜を得ることができる。つまり、これまで人工脂質二重膜において脂質の組成を変更するために、人工脂質二重膜形成工程を再度行って人工脂質二重膜を最初から形成し直す必要があったものを、本方法では、既に形成されている人工脂質二重膜を破壊することなく脂質の組成を変更させることができる。
- [0034] ここで、本方法の人工脂質二重膜を構成する脂質としては、上述のリン脂質が好適に用いられるが、人工脂質二重膜を形成するものであれば特に限定されない。具体的には、例えば、ホスファチジルコリン、ジフィタノイルホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等が挙げられる。これらのリン脂質の2

本の炭化水素鎖は、10個〜24個の炭素長であることが好ましい。また、上記炭化水素鎖は、飽和炭化水素であつてもよいし、不飽和炭化水素であつてもよい。これらの脂質は純粋なものを用いてもよいし、少なくとも2種類の脂質を混合したものであつてもよい。また、イオンチャネルの活性維持のために、必要に応じて、例えば、コレステロール等を添加してもよい。

[0035] 上記脂質溶液とは脂質を有機溶媒に溶解させたものを意味する。この脂質溶液に用いられる有機溶媒としては、非極性有機溶媒であれば特に限定されるものではない。具体的な一例としては、例えば、デカン、ヘキサデカン、ヘキサン等の飽和炭化水素やスクアレン等が好適に用いられる。また、脂質濃度は5〜40mg/mlであることが好ましく、15〜20mg/mlであることがより好ましい。これにより、安定な人工脂質二重膜を迅速に形成することが可能となる。

[0036] また、上記人工脂質二重膜には、チャネル分子として、膜タンパク質からなるイオンチャネルが組み込まれていてもよい。イオンチャネルが組み込まれた上記イオンチャネルには、生体膜や人工膜においてイオンチャネルとして機能するあらゆるものが含まれる。このイオンチャネルとしては、アンフォテリシンB、バリノマイシンなどの抗生物質、ヘモリシン等細菌毒素によって形成されるチャネル、電依存性Naチャネル、アセチルコリン受容体チャネルなど生体のあらゆる種類のチャネルが含まれる。

[0037] このイオンチャネルは、生物が生命活動を維持するための非常に重要な要素であり、種々の疾患の原因にもなりやすい。それゆえ、このイオンチャネルの機能解析は、医学・細胞工学の基礎研究および応用開発において重要である。イオンチャネルとして働く膜タンパク質の機能は、膜の脂質組成に依存している。

[0038] そこで、本発明の脂質置換方法を用いれば、人工脂質二重膜におけるイオンチャネルの機能を解析するための脂質平面膜法において、イオンチャネルにおけるイオン透過の測定を行いながら人工脂質二重膜の脂質組成を変更することができる。つまり、人工脂質二重膜の脂質組成の変化とイオンチャネルにおけるイオン透過との関係を経時的に観察することができる。

[0039] 上記細管17の素材は、化学試験、生化学試験などで細管として使用されるものであれば特に限定されることはないが、例えば、ガラス、プラスチックなどが好適に使用

される。また、上記細管17のバルク相Bと接触する先端部の開口径は、 $5\mu\text{m}$ ～ $20\mu\text{m}$ であることが好ましい。上記細管17の素材としてガラスを用いる場合、例えば、口径1～1.5mmの市販のガラス管を熱伸展して先端口径を $5\mu\text{m}$ ～ $20\mu\text{m}$ とすればよい。

- [0040] なお、人工脂質二重膜のバルク相Bとの接触位置を調節するために、上記細管17の上端部は、微動マニピレータと接続されていることが好ましい。これによれば、細管17をバルク相Bの所望とする位置へ接触させ、バルク相Bへ確実に第2の脂質溶液を注入することができ、人工脂質二重膜における脂質の置換が確実に実現される。なお、上記細管17に上記添加・注入手段が取り付けられている場合には、上記微動マニピレータはこの添加・注入手段に接続されている。
- [0041] さらに、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法においては、上記脂質溶液添加工程の後に、余分な上記第1の脂質溶液を上記細管を用いて吸引する脂質溶液吸引工程がさらに含まれることが好ましい。この脂質溶液吸引工程における余分な脂質溶液の吸引にも、上述の添加・注入手段を細管に接続させて利用することができる。
- [0042] この脂質溶液吸引工程がさらに含まれることによって、脂質二重膜を迅速に形成できるという効果を得ることができる。
- [0043] 本発明にかかる脂質置換方法における、人工脂質二重膜の脂質置換の具体例としては、後述の実施例に示すような、上記第1の脂質溶液としてエルゴステロールを含まないもの、上記第2の脂質溶液としてエルゴステロールを含むものを用い、かつ、チャネル分子としてアンフォテリシンBを組み込ませたものを挙げることができる。
- [0044] アンフォテリシンBは、抗生物質の一種であり、脂質二重膜に水相から入り込みイオンチャネルを形成する。そして、このアンフォテリシンBは、エルゴステロールを多く含む真菌の細胞膜においてはチャネル分子として機能を発揮するが、エルゴステロールを少量しか含まないヒトの細胞膜においては機能を発揮しないと考えられている。
- [0045] そこで、本発明の脂質置換方法を用いて、エルゴステロールを含まない人工脂質二重膜を形成した後、細管からエルゴステロールを含む第2の脂質溶液をバルク相に添加して脂質の置換を行い、エルゴステロールを含む人工脂質二重膜を形

成する。この脂質置換の間、アンフォテリシンBを膜の上方に添加した状態にしておけば、人工脂質二重膜における脂質組成の変化に伴うアンフォテリシンBの活性の変化を観察することができる。

[0046] 実際、実施例にも示すように、エルゴステロールを添加して、エルゴステロールを含む人工脂質二重膜を形成することによって、アンフォテリシンBの活性が生じたことが確認された。

[0047] これ以外にも、例えば、第1の脂質溶液としてホスファチジルコリン等正味の電荷を持たない脂質を用い、第2の脂質溶液としてホスファチジルエタノールアミン等荷電した脂質を含むものを用い、チャネル分子として骨格筋筋小胞体Kチャネルを用いて、脂質二重膜の脂質組成とチャネルとの関係を調査することができる。

[0048] また、本発明にかかる人工脂質二重膜は、ここで説明した人工脂質二重膜の置換方法を用いて第1の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜から、第2の脂質溶液中の脂質を含む人工脂質二重膜へと脂質の組成が変化したものである。

[0049] 上記の人工脂質二重膜は、それに組み込まれるイオンチャネルの機能解析に有効に利用することができるだけでなく、人工脂質二重膜の脂質組成によるチャネル分子組み込みの可否の判定に利用することもできる。

[0050] (3) 人工脂質二重膜の製造装置について

次に、本発明にかかる人工脂質二重膜の製造装置について説明する。

[0051] 本発明の人工脂質二重膜の製造装置の一例の概略構成を図1に示す。本発明の人工脂質二重膜製造装置は、水溶液13で満たされた上溶液槽(第1の溶液槽)11と下溶液槽(第2の溶液槽)12という2つの溶液槽を備えている。図1に示すように、上記の製造装置1では、下溶液槽12に比べて大きさの小さい上溶液槽11が、下溶液槽12内に配置されている。そして、図1に示す製造装置1において、「第1の溶液槽と第2の溶液槽との間に配置され、上記2つの溶液槽を仕切る隔壁」とは、上溶液槽11の底面のことを意味する。そのため、ここでは、上溶液槽11の底面のことを隔壁15とする。

[0052] 上記隔壁15には、開口部16が設けられている。上記の製造装置1においては、この開口部16の周辺に第1の脂質溶液を塗布することによって、開口部16に人工脂

質二重膜を形成することができる。ここで、人工脂質二重膜が形成される仕組みについては、上記(1)で説明した通りである。

[0053] さらに、本発明の製造装置1においては、上記開口部16が設けられている位置の近傍の隔壁15、すなわち、人工脂質二重膜のバルク相が形成される部分の隔壁15に、脂質置換用の細管17が取り付けられている。この細管17は、上述の(2)の脂質置換方法の項で説明したものと同様の機能を果たすものであり、上述の(2)の脂質置換方法の項で説明したものと同一方法で得ることができるので、ここではその説明を省略する。該細管17から上記第1の脂質溶液とは組成の異なる第2の脂質溶液を注入することによって、上記第2の脂質溶液中の脂質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することができる。また、上記細管17には、上述の添加・注入手段が接続されていることが好ましい。これによって、第2の脂質溶液の注入・添加、および、余分な第1の脂質溶液の吸引などを容易に行うことができる。

[0054] 以上のように、上記製造装置1は、先ず、第1の脂質溶液中の脂質によって人工脂質二重膜を形成し、さらに、第2の脂質溶液を細管17を通して脂質二重膜のバルク相へ添加することによって、脂質二重膜の脂質組成を変化させ、第2の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜を形成するというものである。

[0055] つまり、本発明の人工脂質二重膜製造装置は、上述の(2)の脂質置換方法を利用したものであり、本発明にかかる人工脂質二重膜を作製することができるものであると言える。それゆえ、この人工脂質二重膜を形成する際に必要な各要素(脂質、脂質溶液、チャネル分子など)については、上述の(2)の脂質置換方法において説明したものを同様に使用することができる。

[0056] また、上記製造装置1の細管17の上端側には、微動マニピレータ18が接続されている。これによれば、細管17を人工脂質二重膜のバルク相の所望とする位置へ接触させ、バルク相へ確実に第2の脂質溶液を注入することができるため、人工脂質二重膜における脂質の置換が確実に実現される。なお、上記細管17に上記添加・注入手段が取り付けられている場合には、上記微動マニピレータはこの添加・注入手段に接続されている。この微動マニピレータ18は、特に限定されることはなく従来公知の種々のものを用いることができるが、例えば、水圧式、油圧式、ピエゾ式

のものを好適に使用することができる。

[0057] 上記の2つの溶液槽11・12の形状は、特に限定されるものではないが、例えば、円筒形状のものをを用いることができる。また、上記2つの溶液槽の材質も、上溶液槽11の底面をなす隔壁15以外は、特に限定されることはないが、例えば、ガラス、プラスチック等が用いられる。上記隔壁15の材質は、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン等のプラスチック、テフロン(登録商標)等が好適に用いられる。また、上記隔壁15の厚さに関しては、浮遊電気容量を減らすためには厚い方がよいが、開口部16が厚いと、その開口に沿って膜が移動する可能性があり不安定になる。したがって、隔壁15は、通常、0.1〜0.3mm程度の誘電体の板を用いて作成し、開口部16の周辺に限り上記の厚さ(0.1〜0.3mm)よりも薄く加工することが好ましい。

[0058] また、上記水溶液は、界面活性剤、有機溶媒等を含まなければ特に限定されるものではない。上記水溶液の好ましい一例としては塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム等の塩が溶解されている水溶液が挙げられる。なお、上記上溶液槽11内の水溶液と下溶液槽12内の水溶液とは、同一の組成および濃度に調製されていてもよいし、異なる濃度および組成であってもよい。

[0059] また、上記開口部16は、隔壁15のほぼ中央部に円形状に設けられていることが好ましい。また、上記円形状の開口部の直径は、0.05〜0.5mmであることが好ましく、この程度の大きさの開口には、最も安定した膜を迅速に形成することができる。

[0060] (4)イオン透過測定装置について

また、上記人工脂質二重膜の製造装置において、溶液槽中の水溶液を流れる電流を検出する電極を取り付ければ、イオン透過測定装置として使用することもできる。

[0061] すなわち、本発明のイオン透過測定装置は、水溶液13で満たされた2つの溶液槽である、上溶液槽(第1の溶液槽)11および下溶液槽(第2の溶液槽)12と、上記水溶液13中を流れる電流を検出する電極14とを備え、上記電極14が電流を検出することによって、上記上溶液槽11と上記下溶液槽12との境界の隔壁15に形成された人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオンの透過を測定するものである。

- [0062] なお、上記人工脂質二重膜は、上溶液槽11と下溶液槽12との間に配置された隔壁15に設けられた開口部16に形成されており、上記開口部16近傍の隔壁15には、脂質置換用の細管17が取り付けられている。
- [0063] 図3には、本発明にかかるイオン透過測定装置の具体例を示す。図3に示すイオン透過測定装置2は、水溶液13で満たされた上溶液槽(第1の溶液槽)11と下溶液槽(第2の溶液槽)12という2つの溶液槽を備えている。このイオン透過測定装置2では、上述の人工脂質二重膜製造装置1と同じく、下溶液槽12に比べて大きさの小さい上溶液槽11が、下溶液槽12内に配置されている。そして、イオン透過測定装置2において、「第1の溶液槽と第2の溶液槽との間に配置された隔壁15」とは、上溶液槽11の底面のことを意味する。そのため、ここでは、上溶液槽11の底面のことを隔壁15とする。
- [0064] 上記隔壁15には、開口部16が設けられており、この開口部16の周辺に第1の脂質溶液を塗布することによって、開口部16に人工脂質二重膜を形成することができる。ここで、人工脂質二重膜が形成される仕組みについては、上記(1)で説明した通りである。
- [0065] また、上記イオン透過測定装置2には、電極14が備えられており、水溶液中を流れる電流を測定することによって、開口部16に形成された人工脂質二重膜におけるイオンの透過を測定することができる。この電極14は、従来公知のイオン透過測定装置の電極として使用されているものを用いればよく、特に限定されるものではない。この電極14には、Ag-AgCl電極を用いることが多い。
- [0066] さらに、上記イオン透過測定装置2においては、上記開口部16が設けられている位置の近傍の隔壁15、すなわち、人工脂質二重膜のバルク相が形成される部分の隔壁15に、脂質置換用の細管17が取り付けられている。この細管17は、上述の(2)の脂質置換方法の項で説明したものと同様の機能を果たすものであり、上述の(2)の脂質置換方法の項で説明したものと同一方法で得ることができるので、ここではその説明を省略する。
- [0067] 上記のイオン透過測定装置2においては、該細管17から上記第1の脂質溶液とは組成の異なる第2の脂質溶液を注入することによって、上記第2の脂質溶液中の脂

質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することができる。また、上記細管17には、上述の添加・注入手段が接続されていることが好ましい。これによって、第2の脂質溶液の注入・添加、および、余分な第1の脂質溶液の吸引などを容易に行うことができる。

- [0068] 以上のように、上記イオン透過測定装置2は、先ず、第1の脂質溶液中の脂質によって人工脂質二重膜を形成した後、第2の脂質溶液を細管17を通して脂質二重膜のバルク相へ添加することによって、脂質二重膜の脂質組成を変化させ、第2の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜を形成する。そして、ここで形成されている人工脂質二重膜の脂質組成が、第1の脂質溶液中の脂質組成から、第2の脂質溶液に含まれる脂質組成へ置換される過程において、電極14によって人工脂質二重膜におけるイオン透過を常に測定することができる。
- [0069] つまり、本発明のイオン透過測定装置は、上述の(2)の脂質置換方法を利用して、人工脂質二重膜の脂質組成を変えながらイオン透過を測定することのできるものであると言える。それゆえ、この脂質置換に必要な各要素については、上述の(2)の脂質置換方法において説明したものを同様に適用することができる。上記のイオン透過測定装置によれば、人工脂質二重膜の脂質組成の変化とイオンチャネルにおけるイオン透過との関係を経時的に観察することができる。それゆえ、イオンチャネルの機能解析を行う上で非常に有用である。
- [0070] また、上記イオン透過測定装置2の細管17の上端側には、微動マニピレータ18が接続されている。これによれば、細管17を人工脂質二重膜のバルク相の所望とする位置へ接触させ、バルク相へ確実に第2の脂質溶液を注入することができるため、人工脂質二重膜における脂質の置換が確実に実現される。なお、上記細管17に上記添加・注入手段が取り付けられている場合には、上記微動マニピレータはこの添加・注入手段に接続されている。この微動マニピレータ18は、特に限定されることはなく従来公知の種々のものを用いることができるが、例えば、水圧式、油圧式、ピエゾ式のものを好適に使用することができる。
- [0071] なお、本発明のイオン透過測定装置には、下溶液槽12の底面と対向する位置に光学測定装置が備えられていてもよい。これにより、イオンチャネルを介して流れる

電流の測定と同時に、イオンチャネルを光学的に観察することが可能となる。かかる観察としては、例えば、ゲートの開閉に伴う蛍光標識したイオンチャネルの蛍光強度の変化、イオンチャネルの動き、2つの蛍光染料間のエネルギー転移によるスペクトルの変化等の観察が挙げられる。また、人工脂質二重膜が形成されていること、および、人工脂質二重膜における脂質置換の様子を上記光学測定装置により観察することも可能である。さらに、蛍光標識した脂質を用いた人工脂質二重膜を用いて脂質分子の動きを観察することもできる。もちろん光学測定はこれらに限定されるものではなく、従来公知のあらゆる方法が適用される。上記光学測定装置としては例えば、近接場光励起蛍光顕微鏡、光学顕微鏡、分光光度計等が挙げられる。

[0072] (5) 本発明の利用方法について

本発明の人工脂質膜における脂質置換方法を利用すれば、既に形成されている人工脂質二重膜を直接脂質置換、詳細には人工脂質二重膜に含まれる第1の脂質溶液を当該第1の脂質溶液とは異なる第2の脂質溶液に置換して、脂質組成の異なる人工脂質二重膜を形成することができる。さらに、本発明のイオン透過測定装置を利用すれば、上記のように脂質置換される人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオン透過の様子を確認することができる。

[0073] それゆえ、本発明は、例えば、イオンチャネルの機能に対する脂質分子の影響評価に用いることができる。つまり、イオンチャネル研究のための脂質平面膜法に本発明を応用すれば、様々なイオンチャネルに対する脂質二重膜の脂質組成の影響を調べることができる。イオンチャネルは、組み込まれる脂質二重膜の脂質組成と密接に関連している場合が多く、特定の脂質のみに活性を有するものも多数存在する。したがって、イオンチャネルと脂質二重膜の脂質組成との関係を調査することは、イオンチャネルの機能解析において重要であり、本発明の有用性は高い。

[0074] また、本発明のイオン透過測定装置は、疾患に関与するイオンチャネルを用いた創薬におけるスクリーニングや薬理試験に用いることができる。イオンチャネルとして機能する膜タンパクは、種類も多く、ほとんどすべての細胞に分布しており、これらは疾患の原因にもなりやすい。このことから、イオンチャネルをターゲットとする多くの薬剤の開発が将来に渡って見込まれる。また、既に開発されているイオンチャネルをタ

ターゲットとする薬剤の中には、特定の脂質に活性を示すものも多数存在する。それゆえ、本発明を利用してイオンチャネルの活性に対する脂質分子の影響を評価すれば、上記の薬剤の薬理実験にて、特定の脂質の効果を直接確認することができる。特に、向精神薬など神経系に作用する薬は、チャネルタンパクに直接働くものが多く、この分野の創薬に好適に用いることができる。また、農薬の創薬に際しては、逆に、人間のチャネルに作用しないものを選択するために用いることができる。

〔実施例〕

以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

- [0075] 本実施例では、上記第1の脂質溶液としてエルゴステロールを含まないもの、上記第2の脂質溶液としてエルゴステロールを含むものを用い、かつ、チャネル分子としてアンフォテリシンBを用いて、チャネル分子の機能に対する人工脂質二重膜の脂質分子の影響を評価した。
- [0076] 本実施例においては、上述のイオン透過測定装置(図3参照)を用いて、開口部16に形成した人工脂質二重膜におけるイオン透過を測定することによって、チャネル分子に対する脂質の影響を評価した。
- [0077] 先ず、エルゴステロールを含まない第1の脂質溶液として、ホスファチジルコリン(Avanti製)を有機溶媒デカンに濃度20mg/mlとなるように溶解した脂質溶液を用いて、上記の実施の形態に記載の手順に従って自立型水平膜の人工脂質二重膜を形成した。なお、上溶液槽11および下溶液槽12内に満たされた水溶液は、3M KCl, 10mM Hepes/Tris (pH7.4)であった。
- [0078] 続いて、DMSO(Sigma製)に溶解したアンフォテリシンB(Sigma製)を、形成した脂質二重膜の上方から 10^{-7} M程度添加した。アンフォテリシン添加後から、電極14において、経時的に電流を検出した(図4参照)。
- [0079] ここで、20分程度放置したが、電流に変化が見られず、イオンチャネルの活性がないことを確認した。その後、第2の脂質溶液として調製した、エルゴステロール(ナカライテスク製)を有機溶媒デカンに濃度5mg/mlとなるように溶解した脂質溶液を、細管11から人工脂質二重膜のバルク相へ添加した。この間も、電極14において、経時

的に電流を検出した。

[0080] 図4には、電極14において電流を検出した結果を経時的に示す。図4には、エルゴステロール溶液を添加してから約数分経過した後の電流検出結果を、時間経過の順に上段から記載している。図4には示していないが、第1の脂質溶液から形成されたホスファチジルコリン人工膜では、アンフォテリシンBを添加しても電流に変化が見られず、ホスファチジルコリンに対してアンフォテリシンBはチャネル活性を示さないことが判った。

[0081] しかし、図4に示すように、第2の脂質溶液としてエルゴステロール溶液を添加した数分後には、電流に変化が見られ、エルゴステロールに対してアンフォテリシンBがチャネル活性を示すことが確認された。この結果から、上記第2の脂質溶液を添加することによって、人工脂質二重膜において脂質組成が変化し、アンフォテリシンBがイオンチャネルとしての機能を発揮することが裏付けられた。

[0082] 以上の実施例の結果から、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法によって、人工脂質二重膜の脂質の組成を簡単に変えることができることが示された。また、本発明のイオン透過測定装置によって、人工脂質二重膜を形成する特定の脂質のチャネル分子に対する効果を確認することができることが示された。

[0083] 本発明のイオン透過測定装置は、イオンチャネルの機能に対して脂質分子が及ぼす影響を調査することができ、イオンチャネルの機能解析に役立てることができる。イオンチャネルは、種類も多く、ほとんどすべての細胞に分布して生体が生存するために重要な役割を果たすことから、疾患の原因にもなりやすい。そのため、イオンチャネルをターゲットとする薬剤が、今後益々必要とされるようになると予想される。本発明は、イオンチャネルをターゲットとする薬剤開発におけるスクリーニングや薬理試験にも利用できる可能性を有しているため、その有用性は高いと言える。

[0084] 以上のように、本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法(人工脂質二重膜の製造方法)は、人工脂質二重膜のバルク相に脂質置換用の細管を取り付け(接触させ)、該細管から上記人工脂質二重膜を形成している第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を添加することを特徴とするものである。

[0085] なお、ここで人工脂質二重膜の「バルク相」とは、脂質平面膜法によって形成された

人工脂質二重膜において、脂質二重膜部分を取り囲むように形成されている脂質溶液からなる環状の相のことを意味する。

[0086] また、本発明の脂質置換方法は、第1の脂質溶液を用いて脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜形成工程と、脂質置換用の細管に上記第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を注入する脂質溶液注入工程と、上記細管を上記脂質二重膜のバルク相に接触させ、上記第2の脂質溶液をバルク相へ添加する脂質溶液添加工程とからなることを特徴としている。

[0087] 上記の脂質置換方法によれば、第1の脂質溶液中の脂質によって形成された人工脂質二重膜から、連続して第2の脂質溶液中の脂質からなる人工脂質二重膜を得ることができる。つまり、これまで人工脂質二重膜において脂質の組成を変更するために、人工脂質二重膜形成工程を再度行って人工脂質二重膜を最初から形成し直す必要があったものを、本方法では、既に形成されている人工脂質二重膜を破壊することなく脂質の組成を変更させることができる。

[0088] また、上記脂質置換方法には、上記脂質溶液添加工程の後に、余分な上記第1の脂質溶液を上記細管を用いて吸引する脂質溶液吸引工程がさらに含まれていてもよい。また、本発明の脂質置換方法において、上記人工脂質二重膜形成工程は、ペインティング法あるいはフォールディング法によって行われてもよい。また、本発明の脂質置換方法において、上記人工脂質二重膜には、チャネル分子が組み込まれていることが好ましい。また、本発明の脂質置換方法において、上記第1の脂質溶液は、エルゴステロールを含まないものであり、上記第2の脂質溶液は、エルゴステロールを含むものであり、かつ、上記チャネル分子はアンフォテリシンBであってもよい。

[0089] また、本発明の人工脂質二重膜は、上記の何れかの人工脂質二重膜の置換方法を用いて、脂質組成が変えられた人工脂質二重膜である。この人工脂質二重膜は、形成された後に脂質の組成を変化させることができるため、組み込まれるイオンチャネルの機能解析に有効に利用することができる。

[0090] また、本発明の人工脂質二重膜製造装置は、水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置され、上記2つの溶液槽を仕切る隔壁とを備え、上記隔壁に設けられた

開口部の周辺に第1の脂質溶液を塗布することによって、該開口部に脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜製造装置において、上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられており、上記細管から上記第1の脂質溶液とは組成の異なる第2の脂質溶液を注入することによって、上記第2の脂質溶液中の脂質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することを特徴とするものである。また、本発明の人工脂質二重膜製造装置において、上記細管は、微動マニピレータに接続されていることが好ましい。

[0091] また、本発明の人工脂質二重膜製造装置は、水溶液を蓄積可能な第1の溶液槽と、当該第1の溶液槽の内側に配置された第2の溶液槽と、上記第2の溶液槽の底部に設けられ、上記2つの溶液槽を仕切る隔壁とを備え、上記隔壁に設けられた開口部の周囲に第1の脂質溶液を塗布することによって、該開口部に脂質二重膜が形成された人工脂質二重膜製造装置において、上記脂質二重膜のバルク相に接触させて、当該バルク相に第1の脂質溶液と異なる第2の脂質溶液を注入する細管（注入手段）が設けられている構成であってもよい。これにより、上記第2の脂質溶液中の脂質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することができる。また、本発明の人工脂質二重膜製造装置において、上記細管は、微動マニピレータに接続されていることが好ましい。

[0092] また、本発明のイオン透過測定装置は、水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記水溶液中を流れる電流を検出する電極とを備え、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との境界に形成された人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオンの透過を測定するイオン透過測定装置において、上記人工脂質二重膜は、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置された隔壁に設けられた開口部に形成されており、上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられていることを特徴とするものである。

[0093] ここで、上記脂質置換用の細管は、隔壁の開口部に形成されている人工脂質二重膜の脂質組成とは異なる組成の脂質溶液を、開口部近傍に形成されている脂質溶液のバルク相に注入するためのものである。上記のイオン透過測定装置によれば、人工脂質二重膜が上記の脂質置換方法によって脂質置換される過程において、イ

オンチャネルでのイオン透過の様子を確認することができる。それゆえ、上記のイオン透過測定装置は、イオンチャネルの機能に対して脂質分子が及ぼす影響を調査することができ、イオンチャネルの機能解析に役立てることができる。

[0094] また、上記イオン透過測定装置において、人工脂質二重膜の形成はペインティング法あるいはフォールディング法を利用して行われてもよい。また、上記のイオン透過測定装置において、上記細管は、微動マニピレーターに接続されていることが好ましい。

[0095] 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

[0096] 本発明の人工脂質二重膜における脂質置換方法によれば、これまで人工脂質二重膜において脂質の組成を変更するために、人工脂質二重膜形成工程を再度行って人工脂質二重膜を最初から形成し直す必要があったものを、既に形成されている人工脂質二重膜を破壊することなく脂質の組成を容易に変更させることができる。また、上記の脂質置換方法を利用して実現される本発明の人工脂質二重膜の製造装置によれば、人工脂質二重膜における脂質組成を自在に変更することの可能な人工脂質二重膜を作製することができる。

[0097] さらに、本発明のイオン透過測定装置によれば、上述のように脂質置換される人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオン透過の様子を確認することができる。それゆえ、上記のイオン透過測定装置は、イオンチャネルの機能に対して脂質分子が及ぼす影響を調査することができ、イオンチャネルの機能解析に役立てることができる。

[0098] イオンチャネルは、種類も多く、ほとんどすべての細胞に分布して生体が生存するために重要な役割を果たすことから、疾患の原因にもなりやすい。このことから、イオンチャネルをターゲットとする薬剤が多く必要とされている。本発明は、イオンチャネルをターゲットとする薬剤開発におけるスクリーニングや薬理試験にも利用できる

可能性を有しているため、その有用性は高いと言える。

請求の範囲

- [1] 人工脂質二重膜のバルク相に脂質置換用の細管を取り付け、該細管から上記人工脂質二重膜を形成している第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を添加することを特徴とする人工脂質二重膜の脂質置換方法。
- [2] 上記第1の脂質溶液を用いて脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜形成工程と、脂質置換用の細管に上記第1の脂質溶液とは異なる組成の第2の脂質溶液を注入する脂質溶液注入工程と、
上記細管を上記脂質二重膜のバルク相に接触させ、上記第2の脂質溶液をバルク相へ添加する脂質溶液添加工程とからなることを特徴とする請求項1に記載の人工脂質二重膜の脂質置換方法。
- [3] 上記脂質置換方法には、上記脂質溶液添加工程の後に、余分な上記第1の脂質溶液を上記細管を用いて吸引する脂質溶液吸引工程がさらに含まれることを特徴とする請求項2に記載の人工脂質二重膜の脂質置換方法。
- [4] 上記人工脂質二重膜形成工程は、ペインティング法あるいはフォールディング法によって行われることを特徴とする請求項2または3に記載の人工脂質二重膜の脂質置換方法。
- [5] 上記人工脂質二重膜には、チャネル分子が組み込まれていることを特徴とする請求項1ないし4の何れか1項に記載の人工脂質二重膜の脂質置換方法。
- [6] 上記第1の脂質溶液は、エルゴステロールを含まないものであり、上記第2の脂質溶液は、エルゴステロールを含むものであり、かつ、上記チャネル分子はアンフォテリシンBであることを特徴とする請求項5に記載の人工脂質二重膜の置換方法。
- [7] 請求項1ないし6の何れか1項に記載の人工脂質二重膜の置換方法を用いて、脂質組成が変えられた人工脂質二重膜。
- [8] 水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置され、上記2つの溶液槽を仕切る隔壁とを備え、
上記隔壁に設けられた開口部の周辺に第1の脂質溶液を塗布することによって、該開口部に脂質二重膜を形成する人工脂質二重膜製造装置において、

上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられており、上記細管から上記第1の脂質溶液とは組成の異なる第2の脂質溶液を注入することによって、上記第2の脂質溶液中の脂質を成分として含む人工脂質二重膜を形成することを特徴とする人工脂質二重膜製造装置。

[9] 上記細管は、微動マニピレーターに接続されていることを特徴とする請求項8に記載の人工脂質二重膜製造装置。

[10] 水溶液で満たされた2つの溶液槽である、第1の溶液槽および第2の溶液槽と、上記水溶液中を流れる電流を検出する電極とを備え、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との境界に形成された人工脂質二重膜に組み込まれたイオンチャネルにおけるイオンの透過を測定するイオン透過測定装置において、

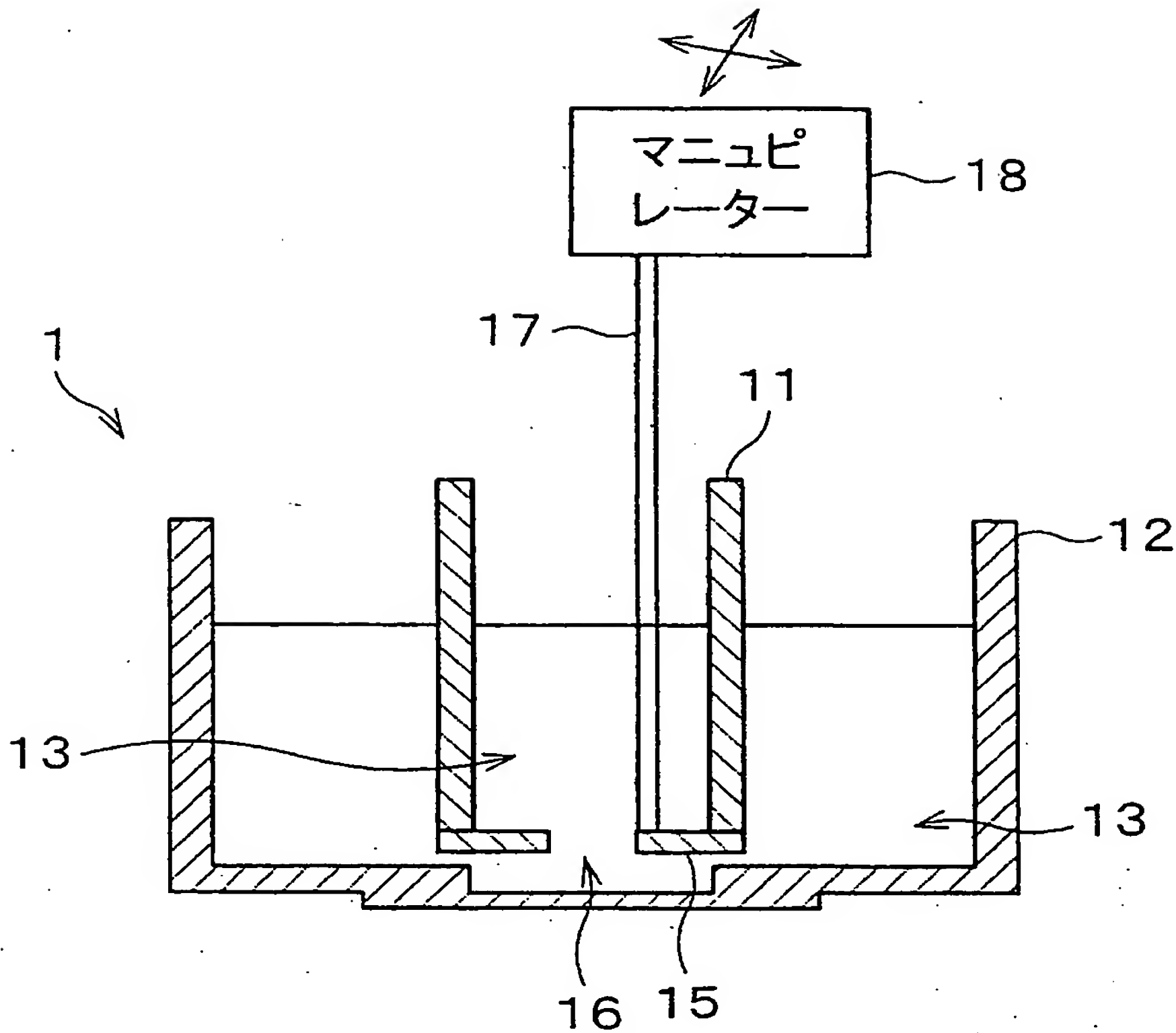
上記人工脂質二重膜は、上記第1の溶液槽と上記第2の溶液槽との間に配置された隔壁に設けられた開口部に形成されており、

上記開口部近傍の隔壁には、脂質置換用の細管が取り付けられていることを特徴とするイオン透過測定装置。

[11] 上記イオン透過測定装置において、人工脂質二重膜の形成はペインティング法あるいはフォールディング法を利用して行われることを特徴とする請求項10に記載のイオン透過測定装置。

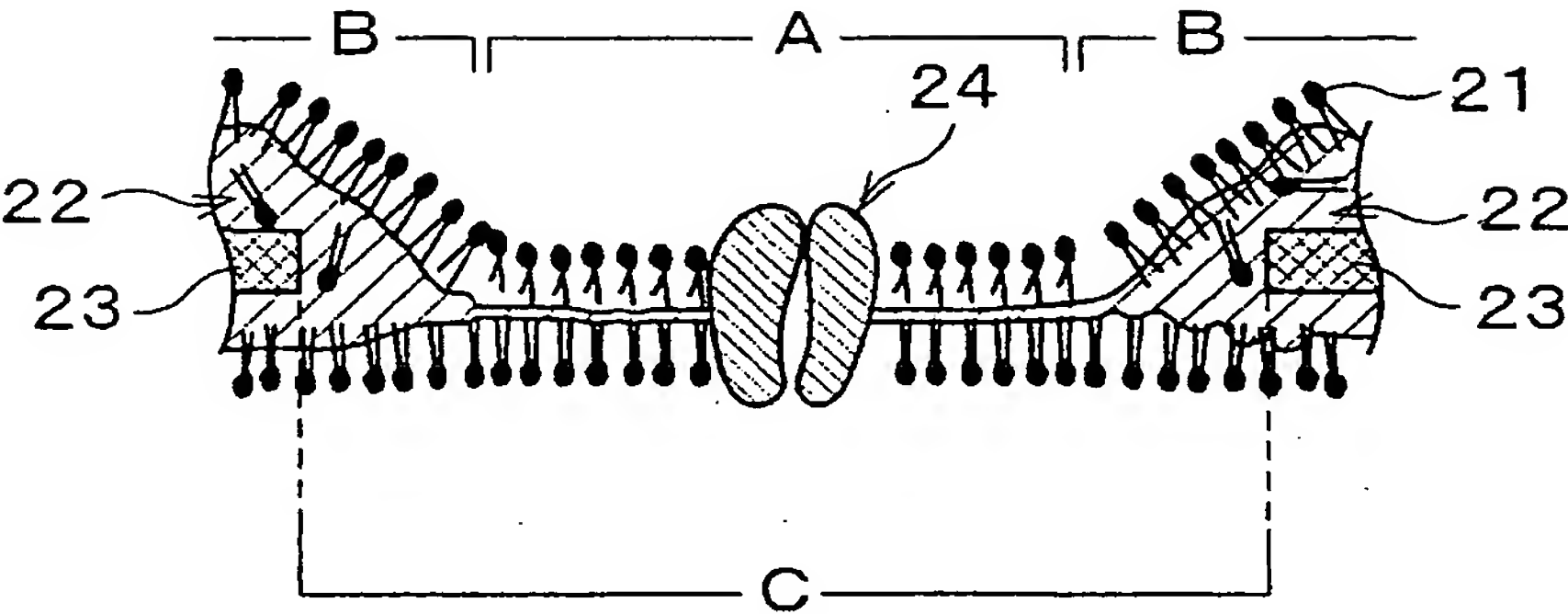
[12] 上記細管は、微動マニピレーターに接続されていることを特徴とする請求項10または11に記載のイオン透過測定装置。

[図1]

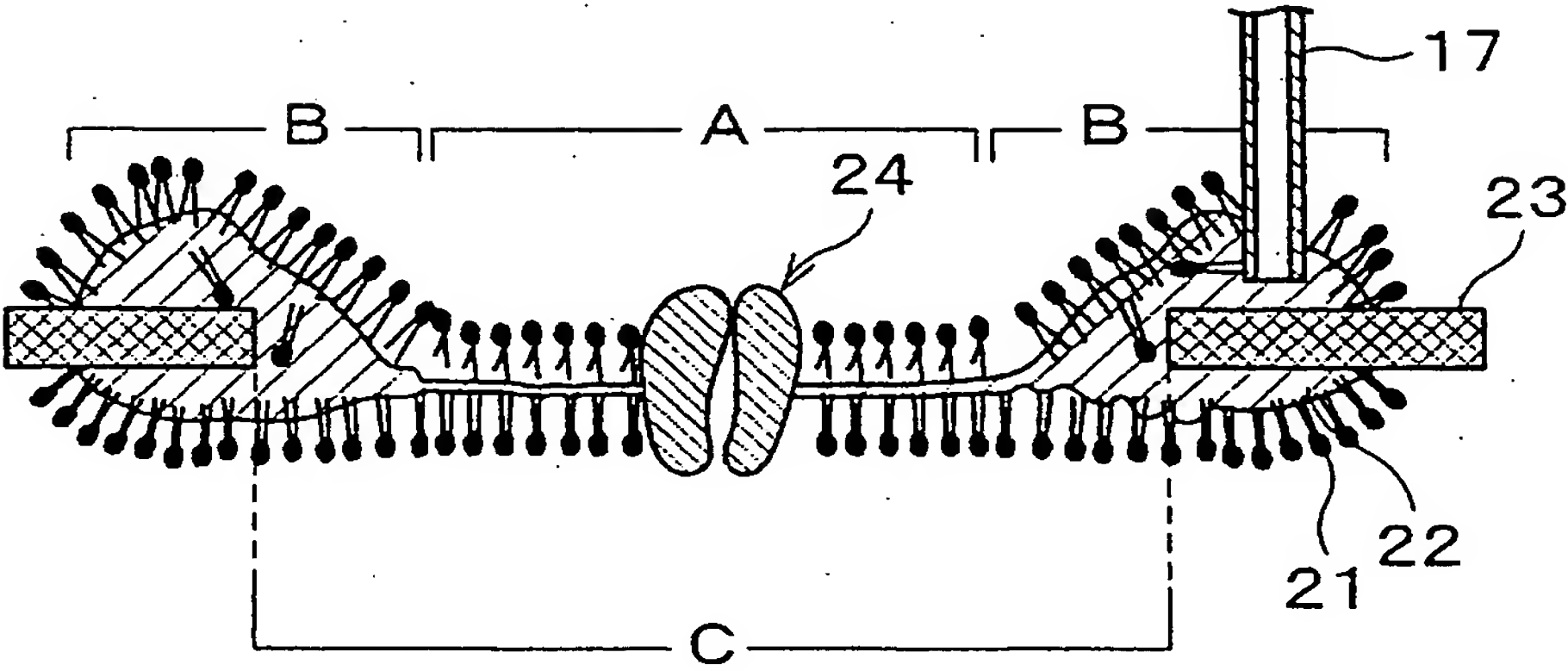


[図2]

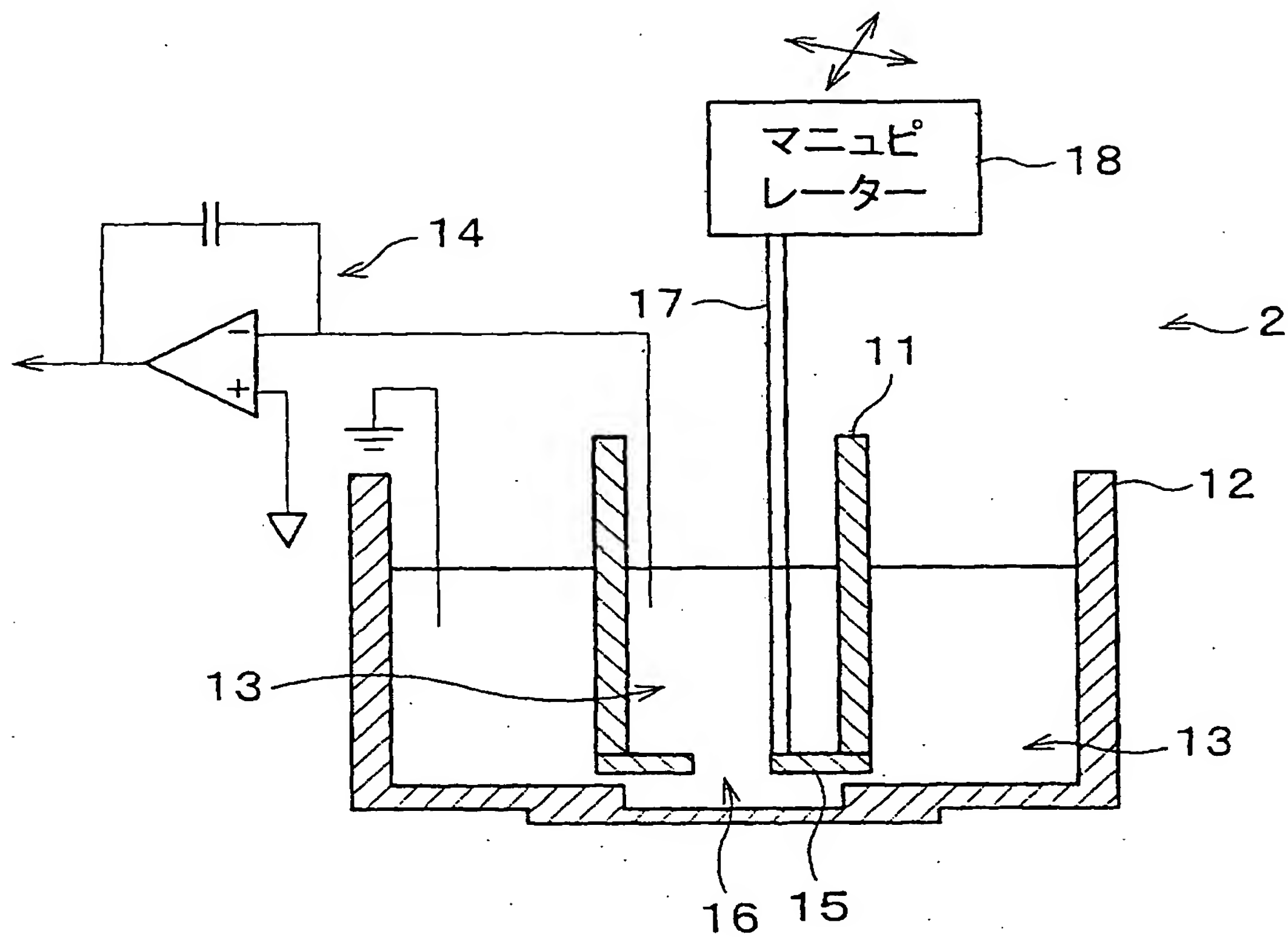
(a)



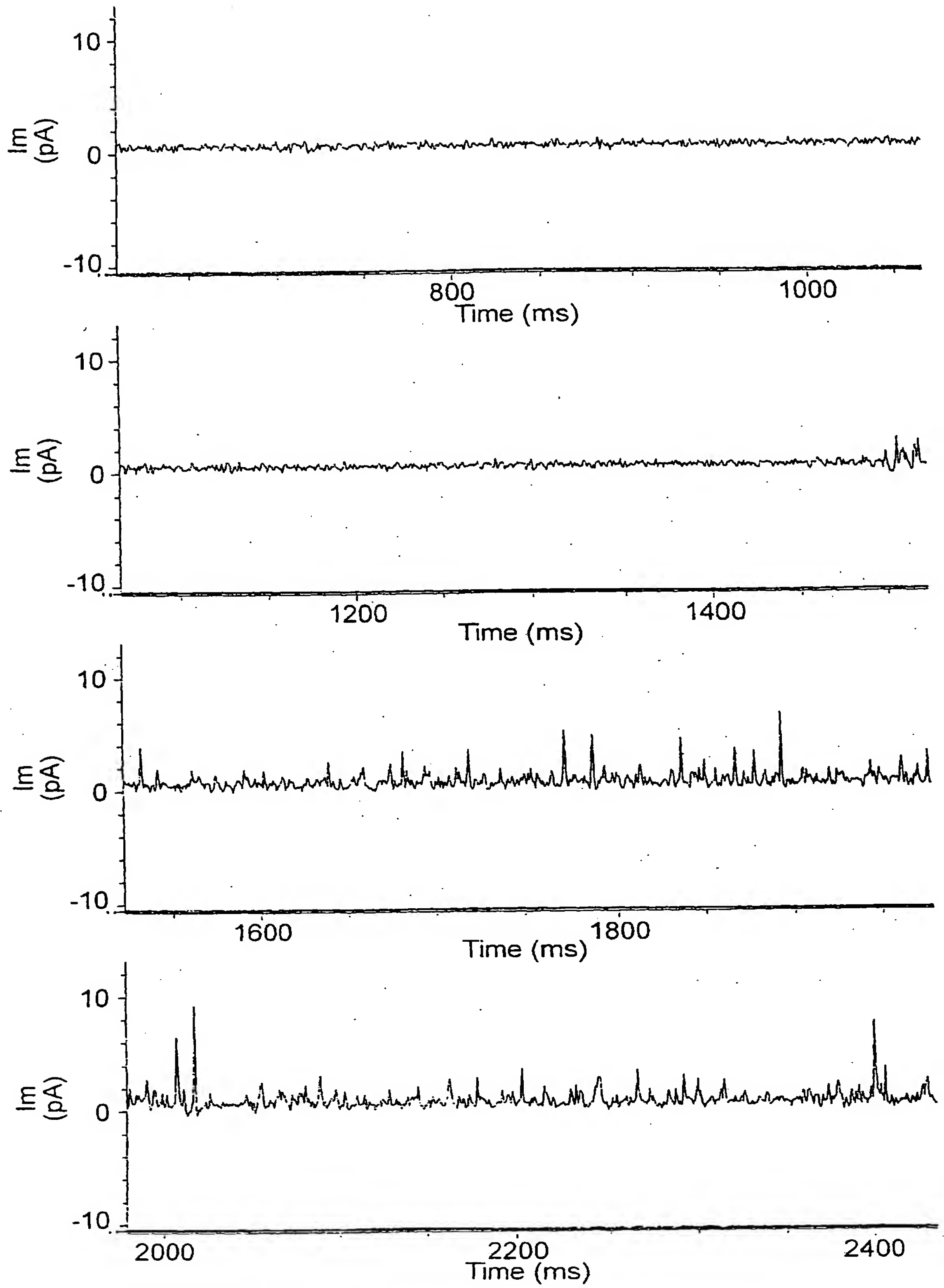
(b)



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N27/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N27/28Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Toru IDE et al., Seirigaku Jikken Koza '1 Bunshi Seirigaku' 'Tan'itsu Channel no Denki-Kogakuteki Doji Keisoku', Nippon Seirishi, Vol.65, No.9, 283-290, (particularly, p.287 (5)-(7), Fig. 3), 01 September, 2003 (01.09.03)	1-12
A	Toru IDE et al., An Artificial Lipid Bilayer Formed on an Agarose-Coated Glass for Simultaneous Electrical and Optical Measurement of Single Ion Channels, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.265, No.2, 595-599, (particularly, page 597, left column, lines 1 to 4), 1999	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November, 2004 (15.11.04)Date of mailing of the international search report
30 November, 2004 (30.11.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013679

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A.G.Macdonald et al., Combined Spectroscopic and Electrical Recording Techniques in Membrane Research: Prospects for Single Channel Studies, Progress in Biophysics & Molecular Biology, Vol.63, No.1, 1-29, 1995	1-12
A	Toshiro HAMAMOTO et al., "Heimen Rin Shishitsu Nijusomaku o Tsukatta Ion Channel no Sokutei", Cell technology, Vol.7, No.1, 87-96, 1988	1-12
A	JP 11-56389 A (Toshiba Corp.), 02 March, 1999 (02.03.99), Full text; all drawings (Family: none)	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	井出徹 他, 生理学実験講座「1分子生理学」「単一チャネルの電気・光学的同時計測」, 日本生理誌, Vol. 65, No. 9, 283-290, 2003.09.01	1-12
A	Toru Ide et al, An Artificial Lipid Bilayer Formed on an Agarose-Coated Glass for Simultaneous Electrical and Optical Measurement of Single Ion Channels, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 265, No. 2, 595-599, 1999	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.11.2004

国際調査報告の発送日

30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷垣 圭二

2J

3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	A. G. Macdonald et al, Combined Spectroscopic and Electrical Recording Techniques in Membrane Research: Prospects for Single Channel Studies, Progress in Biophysics & Molecular Biology, Vol. 63, No. 1, 1-29, 1995	1-12
A	浜本敏郎 他, 平面リン脂質二重層膜を使ったイオンチャネルの測定, 細胞工学, Vol. 7, No. 1, 87-96, 1988	1-12
A	J P 11-56389 A (株式会社東芝) 1999.03.02, 全文全図 (ファミリーなし)	1-12